



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Aislamiento y purificación de un alérgeno de guantes
manufacturados con hule natural**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

FLOR DE MARÍA DEL CARMEN CARRILLO NAVA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

VOCAL: MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

SECRETARIO: ADELA RODRÍGUEZ ROMERO

1ER. SUPLENTE: SONIA MAYRA PEREZ TAPIA

2° SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA, LABORATORIO DE BIOMACROMOLÉCULAS 3

ASESOR DEL TEMA: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO

SUSTENTANTE: FLOR DE MARÍA DEL CARMEN CARRILLO NAVA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química por todo lo que me han brindado.

Al Instituto de Química de la UNAM por brindarme las facilidades y el espacio para la realización de esta tesis.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y siempre tuvo el tiempo para enseñarme y apoyarme en todo momento.

A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo por su ayuda enorme y desinteresada para el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. José Federico Del Río Portilla por sus aportaciones y comentarios.

Al Dr. Cuauhtémoc Sánchez Alvarado por sus comentarios y apoyo.

A todos los miembros del jurado por los comentarios para el mejoramiento de la presente tesis.

A los técnicos académicos del Instituto de Química: Q. Eréndira García Ríos (Laboratorio de cromatografía) y la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya (Laboratorio de Dicroísmo Circular y Espectroscopia de Infrarrojo).

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y amistad.

Al apoyo económico recibido por parte del CONACYT (Proyecto CB2011/166472) y de la DGAPA-UNAM (Proyecto PAPIIT IN207613).

DEDICATORIAS

A mi princesa Isabella, por ser mi más grande motivación para seguir adelante.

A mi madre Violeta por creer siempre en mí, por ser mi ejemplo de superación, por amarme y cuidarme en cada momento.

A mis abuelitos Antonio e Isabel por permitirme formar parte de sus vidas.

A mi esposo Alan por el apoyo sincero e incondicional que me ha brindado.

A mi hermano Fabrizio por cuidarme.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	2
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	16
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	17
Material	
Extracción y purificación	
Cuantificación de proteína	
Curva de calibración	
Estudios electroforéticos	
Estudios de espectrometría de masas MALDI-TOF	
Espectro de absorción UV-visible	
Dicroísmo circular	
Resonancia magnética nuclear ^1H	
Espectroscopía de infrarrojo	
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS	22
Extracción y purificación	
Rendimiento de la purificación	
Masa molecular	
Espectro de absorción de luz UV- visible	
Dicroísmo circular	
Resonancia magnética nuclear ^1H	
Espectroscopía de infrarrojo	
CAPITULO IV. CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

Índice de figuras

Figura 1. Eventos de la hipersensibilidad de tipo I

Figura 2. Distribución del contenido de proteínas y localización de los distintos alérgenos en látex

Figura 3. Agentes vulcanizantes

Figura 4. Estructura tridimensional de Hev b 6.02

Figura 5. Superficie molecular del Hev b 6.02

Figura 6. Curva de calibración de BSA

Figura 7. Perfil cromatográfico de fase reversa

Figura 8. Gel Tris-Tricina-SDS-PAGE para el seguimiento de la purificación de proteína de guante

Figura 9. Espectro de masas de Hev b 6.02 natural

Figura 10. Espectro de masas de proteína de guante

Figura 11. Espectro de absorción de luz UV de Hev 6.02 natural y Hev 6.02 de guante

Figura 12. Espectros de dicroísmo circular de Hev b 6.02 natural y Hev b 6.02 de guante

Figura 13. Espectro de resonancia magnética nuclear de Hev b 6.02 guante

Figura 14. Espectro de infrarrojo de Hev b 6.02 natural

Figura 15. Espectro de infrarrojo de Hev b 6.02 de guante

Índice de tablas

Tabla I. Tipos de hipersensibilidad

Tabla II. Alérgenos reportados del látex por la IUIS

Tabla III. Principales señales del espectro de infrarrojo de Hev b 6.02 natural

Tabla IV. Principales señales del espectro de infrarrojo de Hev b 6.02 guante

Abreviaturas

ACN. Acetonitrilo

AL. Alergia al látex

APC. Células presentadoras de antígeno

ASTM: American Society for Testing and Materials

BCA. Ácido bicinconánico

BSA. Albúmina de suero bovino

DC. Dicroísmo circular

EB. Espina bífida

Fc. Fracción constante

Fc ϵ RI. Receptor de tipo I de la fracción cristalizable tipo épsilon de la IgE

FR. Fase reversa

HPLC. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (High-performance liquid chromatography)

IgE. Inmunoglobulinas de tipo E

IgG. Inmunoglobulinas de tipo G

IgM. Inmunoglobulinas de tipo M

IFN- γ . Interferón gamma

IL-4. Interleucina 4

IL-13. Interleucina 13

IL-18. Interleucina 18

IUIS. Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (The International Union of Immunological Societies)

MALDI-TOF. Espectrometría de Desorción/ ionización láser asistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/ ionization) Tiempo de vuelo (Time of flight)

NK. Células asesinas naturales (Natural Killer)

Nm. Nanómetros

PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS. Buffer de fosfato salino

rpm. Revoluciones por minuto

SDS. Dodecil sulfato de sodio

TFA. Ácido Trifluoroacético

T_H1. Linfocitos T cooperadores de tipo I

T_H2. Linfocitos T cooperadores de tipo II

UV. Ultravioleta

VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana.

WHO. Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)

Resumen

La alergia a productos de látex de *Hevea brasiliensis* ha sido un problema de salud importante en los últimos años, el cual afecta al personal médico y sanitario, trabajadores del hule y pacientes con múltiples intervenciones quirúrgicas. Los guantes de hule de látex natural son uno de los principales productos causantes de la hipersensibilidad de tipo I o alergia al látex debido a la presencia de diversos alérgenos, entre los que se encuentran principalmente Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 y Hev b 6.02. El alérgeno Hev b 6.02 se encuentra de manera abundante en guantes manufacturados con látex de *H. brasiliensis* (Palouso *et al.*, 2007). Esta proteína es una lectina que une oligosacáridos de N-acetil-glucosamina y su estructura tridimensional fue reportada por nuestro grupo de trabajo en 1991 (Rodríguez-Romero, *et al.* 1991). Por otra parte, Hev b 6.02 participa en la reactividad cruzada entre el látex, plantas y frutas. En este trabajo se aisló, purificó y caracterizó al alérgeno Hev b 6.02 a partir de guantes elaborados con látex de *H. brasiliensis*. La extracción se realizó utilizando guantes de exploración estériles marca Sensimedical. Para la purificación de la proteína se usó cromatografía de fase reversa acoplada a un equipo HPLC. La caracterización de la proteína comprendió la determinación de la relación masa/carga mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, donde se encontró la misma masa del Hev b 6.02 natural obtenido a partir de lutoides del látex fresco. El espectro de dicroísmo circular mostró un máximo positivo a 221 nm, característico de este tipo de dominios estructurales, que incluye contribuciones de los puentes disulfuro y de interacciones entre residuos de triptófano. Además, se obtuvo un espectro de ¹H- RMN que sugiere que la proteína de guante se encuentra plegada. Finalmente se obtuvieron los espectros de infrarrojo comparativos entre la proteína natural y la obtenida de guantes, que permitieron determinar que no hay modificaciones químicas importantes de la proteína durante el proceso de manufactura.

Capítulo I

Introducción

Alergia o Hipersensibilidad de Tipo I

La alergia es un problema de salud mundial que afecta a más del 20% de la población, según la Organización Mundial de la Salud (WHO 2003) y se define como una enfermedad producida por la respuesta exagerada del sistema inmunológico ante un antígeno extraño, normalmente inocuo, conocido como alérgeno. Los alérgenos son generalmente proteínas o glicoproteínas de fuentes muy diversas como plantas, insectos o animales, y son altamente inmunogénicos; sin embargo, no existen evidencias que relacionen la actividad biológica de los alérgenos con su capacidad alérgica. Algunos reportes indican que muchas proteínas relacionadas con la defensa de los organismos (Pathogenesis related proteins, PRP) son alérgicas. (Midoro H.T et al., 2001)

La alergia pertenece a las reacciones de hipersensibilidad de tipo I de acuerdo a la clasificación propuesta por Gell y Coombs: Tipo I al IV (Tabla I), con base en el tiempo de aparición de síntomas y los mecanismos involucrados en las mismas. En 2003 Rajan y colaboradores describieron un quinto tipo a la que denominaron hipersensibilidad estimuladora o neutralizante.

Tabla I. Tipos de hipersensibilidad

Tipo de hipersensibilidad	Mediadores
I. Hipersensibilidad inmediata	IgE
II. Hipersensibilidad citotóxica o mediada por anticuerpos	IgG o IgM
III. Mediada por inmunocomplejos	IgG
IV. Mediada por linfocitos T	Linfocitos T
V. Estimuladora o neutralizante	IgG

De forma breve la hipersensibilidad de tipo I se define como una respuesta alérgica inmediata generada por una proteína alergénica que da lugar a la diferenciación de los linfocitos T_H2 y a la síntesis de inmunoglobulinas tipo E (IgE) específicos, favorecida por las citocinas interleucina 4 (IL-4) e IL-13. Los anticuerpos IgE producidos se unen a través de su región constante (Fc) a un receptor de alta afinidad $Fc\epsilon RI$ presente en la superficie de las células cebadas o mastocitos y de los basófilos. (Abbas AK *et al.*, 2007). En una segunda exposición, el alérgeno se une a las IgEs ancladas en la superficie de dichas células y esta unión genera su activación mediante el entrecruzamiento de las moléculas de $Fc\epsilon RI$. Este entrecruzamiento genera tres tipos de respuestas biológicas: secreción del contenido de los gránulos mediante exocitosis, síntesis y secreción de mediadores lipídicos y síntesis y secreción de citocinas (Abbas AK *et al.*, 2007).

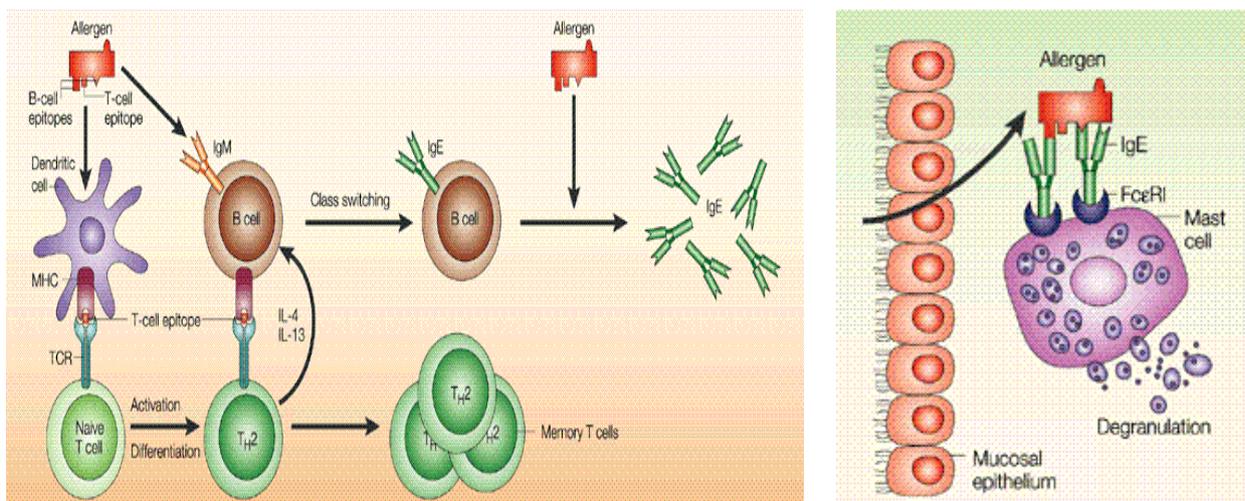


Figura 1. Eventos de la hipersensibilidad de tipo I. La exposición a un alérgeno activa células T_H2 a través de las células presentadoras de antígeno (APC). Los T_H2 estimulan a los linfocitos B para la producción de IgEs. Subsecuente exposición el alérgeno se une a las IgEs presentes en la membrana de los mastocitos, lo cual provoca su activación y degranulación (Hawrylowicz C.M. *et al.*, 2005)

Los factores que influyen en el desarrollo de la hipersensibilidad de tipo I son diversos, en términos generales son individuales y ambientales. Entre los individuales se encuentra la predisposición genética asociada a la existencia de polimorfismos en más de 50 genes localizados en 15 diferentes cromosomas. Los polimorfismos en IL-4, IL-13, IL-18 y en el factor de transcripción GATA-3 y STAT-6

están estrechamente relacionados con la alergia. La IL-18 es producida por una gran variedad de células de la respuesta inmune como monocitos, macrófagos y células dendríticas y es un importante regulador de la respuesta inmune. Los polimorfismos de IL-18 se asocian a enfermedades inflamatorias crónicas porque estimula la síntesis de IL-4 y IL-13 iniciando una respuesta T_H2 y aumentando los niveles de IgEs. (Novak *et al.*, 2005). En individuos normales se conoce que IL-18 se asocia con la IL-12 para inducir la producción de interferón gamma (IFN- γ) en los linfocitos T_H1 , linfocitos B y las células asesinas naturales (NK), lo que polariza la respuesta hacia linfocitos T_H1 y la inhibición de la síntesis de IgEs.

Los polimorfismos asociados a los genes de IL-4/IL-13 y a los factores de transcripción GATA-3 Y STAT-6 presentan una mayor actividad biológica, por lo cual están directamente relacionados con el aumento de los niveles totales de IgEs en suero. (Brown *et al.*, 2005)

Dentro de los factores ambientales se encuentra la contaminación la cual ocasiona una constante exposición a ciertos alérgenos.

La alergia al látex de *Hevea brasiliensis*

El látex del árbol del hule *Hevea brasiliensis* es el más importante desde el punto de vista industrial, dado que a partir del hule que contiene se producen un número importante de artículos de uso doméstico, médico y comercial y además es responsable de los cuadros alérgicos. El látex es el citoplasma de células especializadas denominadas laticíferas, el cual se encuentra constituido por cis1, 4- poliisopreno o hule natural que comprende un 25-45% de su peso, carbohidratos, lípidos y proteínas las cuales comprenden entre 1-5% del peso de látex. Al centrifugarse el látex fresco aproximadamente entre 50,000-70,000 g se obtienen tres fracciones principales: 1) Fase superior formada por poliisopreno o hule natural; 2) Fase intermedia conocida como suero C, la cual contiene el citosol de las células laticíferas y es más rica en proteínas hidrosolubles; 3) El sedimento o suero B, principalmente compuesto por lutoides o vacuolas, ricos en proteínas alérgicas (Yeang *et al.*, 2002) (Figura 2).

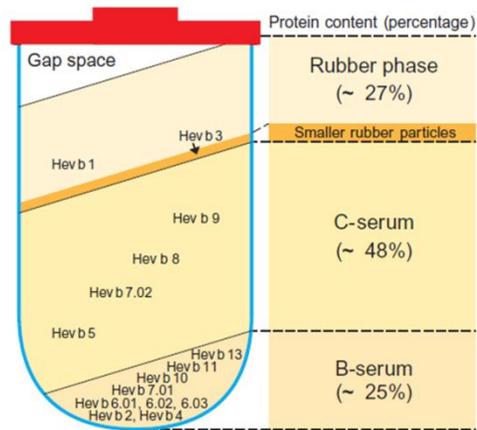


Figura 2. Distribución del contenido de proteínas y localización de los distintos alérgenos en látex centrifugado a 53,000 g (Rihs y Heimsoth, 2003)

En general se han descrito más de 200 proteínas presentes en el látex de *H. brasiliensis*, de las cuales 14 se han clasificado como alérgenos en la base de datos (www.allergen.org/allergen.aspx) establecida por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS). Los principales alérgenos del hule se han denominado como Hev b 1 a Hev b 14 (Tabla II). La nomenclatura consiste de las tres primeras letras del género al cual pertenece el organismo, seguido de la primera letra de la especie y de un número arábigo que indica el orden cronológico de su depósito en la base de datos. Como se muestra en la Tabla II los alérgenos del látex llevan a cabo diferentes funciones biológicas incluyendo enzimas, proteínas de defensa de la planta, proteínas involucradas en la síntesis del poli-isopreno y proteínas estructurales.

Tabla II. Alérgenos de látex

Código IUIS	Nombre	Función	Masa molecular (kDa)
Hev b 1	Factor de elongación	Biosíntesis del látex	14
Hev b 2	Beta 1-3-glucanasa	Defensa	38
Hev b 3	Homólogo de factor de elongación	Biosíntesis del látex	24
Hev b 4	Proteína microhélice	Estructural	50-57
Hev b 5	Proteína ácida	-----	16
Hev b 6.01	Proheveína	Defensa	20
Hev b 6.02	Heveína	Defensa	4.7
Hev b 6.03	C- terminal de Proheveína		14
Hev b 7	Patatina	Estructural	42
Hev b 8	Profilina	Estructural y señalización	15
Hev b 9	Enolasa	Biosíntesis de nutrientes	51
Hev b 10	Superóxido-dismutasa	Eliminación de radicales libres	26
Hev b 11	Quitinasa de clase I	Defensa	30
Hev b 12	Proteína de transferencia de lípidos	Transferencia de lípidos	9
Hev b 13	Proteína nódulo	Esterasa	42
Hev b 14	Hevamina	Defensa	30

El primer reporte de alergia al látex (AL) lo realizó Nuter (Nuter *et al.*, 1979) en 1979; sin embargo, fue hasta los años 80 cuando se observó un incremento importante en el número de personas alérgicas a productos elaborados con látex debido al aumento desmesurado en el uso de guantes y condones de hule, por que se había descubierto que el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y hepatitis B se transmitían por medio de fluidos corporales (Nettis *et al.*, 2002). Como consecuencia de esta situación, en las últimas décadas la alergia al látex ha supuesto un problema socioeconómico y sanitario importante, dando lugar a diversas investigaciones orientadas a la detección y cuantificación de alérgenos de látex para prevenir la sensibilización y la enfermedad. En nuestro país no se conoce la incidencia de AL en la población en general; sin embargo en estudios realizados por nuestro grupo de trabajo permiten estimar una prevalencia de 1.6-1.9%. La prevalencia de AL en la población en general se estima entre un 1-2%.

Los principales casos de AL se producen en grupos de riesgo definidos entre los que destaca el personal al servicio de la salud con una prevalencia del 5-20%, los trabajadores de la industria del hule y los enfermos con espina bífida (EB) y anomalías urogenitales con una prevalencia de 24-60%.

Las manifestaciones clínicas de la AL son muy variables dependiendo de la vía de exposición, que en la mayoría se producen por exposición por vía cutánea, mucosa, parenteral o aérea, la cantidad del alérgeno, la duración del contacto y, como se mencionó anteriormente, la predisposición genética y estas manifestaciones pueden ser locales o sistémicas. Las sistémicas son una combinación de síntomas clínicos tales como dermatitis, urticaria, angioedema, rinitis, conjuntivitis, asma o bien cuadros anafilácticos que pueden provocar la muerte. (K. Turjanmaa *et al.*, 1996)

Productos de hule de látex natural

El látex de *Hevea brasiliensis* se utiliza en la elaboración de más de 40,000 productos de látex, debido a sus propiedades elásticas y de barrera y su resistencia a la tracción. Algunos de los productos que se elaboran a partir de este polímero son de uso doméstico como zapatos, ligas, juguetes, chupones, etc. Por otra parte se encuentran diversos productos de uso médico como guantes de látex, torniquetes, vendajes elásticos, catéteres urinarios; por lo que una gran parte de la población se encuentra expuesta diariamente a productos de látex.

Se han realizado diversos estudios que confirman la presencia de una gran cantidad de los alérgenos de látex en diversos productos de látex de uso doméstico y médico como en los guantes de hule de látex natural. (Crippa *et al.*, 2006)

Guantes de hule de látex natural

En la elaboración de los diversos productos, el hule natural se centrifuga y se preserva en amoniaco, el cual evita su degradación, retarda el crecimiento microbiano e incrementa la estabilidad, además de que las condiciones alcalinas pueden desnaturalizar ciertas proteínas e hidrolizarlas en péptidos. (Perrella WF *et al.*, 2002). Este concentrado de hule se mezcla con diversos compuestos químicos como agentes vulcanizantes (mercaptobenzotiazoles, ditiocarbamatos, tiuram) y antioxidantes (aminas).

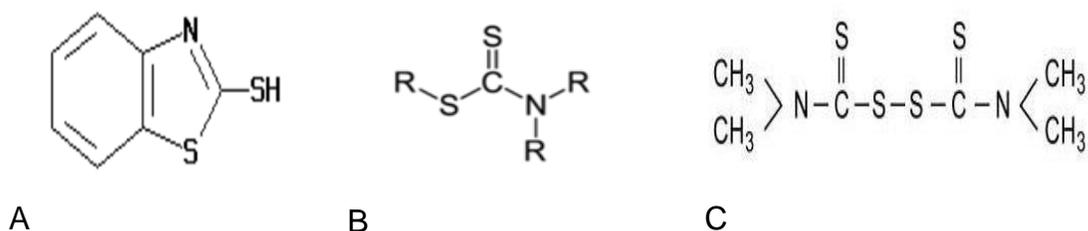


Figura 3. Agentes vulcanizantes A) 2-mercaptobenzotiazol, B) tiocarbamatos C) tiamam

Los métodos de producción de guantes de hule natural implican como primer paso la limpieza de los moldes para obtener una deposición uniforme y continúa del látex. Como siguiente paso se cubren los moldes con coagulante, que es una sustancia química que desestabiliza el látex provocando su agregación y controlando la cantidad que se deposita, y que determina el espesor de los guantes. Posteriormente los moldes se sumergen en la mezcla de látex-compuestos azufrados y se calientan sucesivamente en hornos a temperaturas entre 100°C-120°C, completando lo que se conoce como proceso de vulcanización. Entre cada entrada a los hornos se realiza una lixiviación la cual consiste en sumergir los moldes recubiertos de látex en un baño de agua caliente para eliminar el exceso de productos químicos y proteínas extraíbles de los guantes. Antes de desprenderlos del molde se sumergen en tanques que contienen polvos (almidón de maíz o talco), los cuales actúan como lubricantes. (Yip *et al.*, 2002)

El proceso de manufactura parece no ser lo suficientemente riguroso para eliminar proteínas alergénicas, por lo cual se ha podido determinar su presencia en los guantes de látex y en otros productos elaborados con hule natural (Yunginger *et al.*, 1993; Crippa M *et al.*, 2003; Palosuo T *et al.*, 2007)

Los alérgenos que se utilizan como marcadores para determinar el potencial alergénico de los guantes de látex son Hev b 1, Hev b 3, Hev b 5 y Hev b 6.02 (Palosuo T *et al.*, 2007; Peixinho *et al.*, 2008). Esto es debido a que Hev b 1 y Hev b 3 participan en la sensibilización de los niños con EB por contacto directo de la superficie externa de los guantes, donde se presenta la mayor cantidad de estos alérgenos, con la mucosa interna del paciente durante las cirugías a las cuales son expuestos (Yeang *et al.*, 1996).

Por otra parte, Hev b 5 y Hev b 6.02 participan en la sensibilización de los trabajadores de la salud, la cual ocurre por contacto directo de la superficie interna de los guantes con la piel (C. Peixinho *et al.*, 2008) o por la inhalación de aeroalergenos. Esto último es debido a que las proteínas quedan adsorbidas en la superficie de los polvos, tales como talco o almidón, incrementando su exposición por vía aérea (Yip *et al.*, 2002). Las diferencias en la distribución de los alérgenos en las diferentes superficies del guante parecen estar relacionadas con el proceso de fabricación.

El contenido de proteínas totales en los diferentes tipos de guante que se utilizan en los hospitales es muy diferente. Los más utilizados son: guantes quirúrgicos de hule natural libres de polvo y lubricados, guantes de examinación lubricados, guantes de nitrilo y vinilo, este último no contienen proteínas. Los que presentan un contenido significativamente mayor de proteínas son los guantes quirúrgicos y de exploración manufacturados con hule natural, mientras que los guantes libres de polvo tienen un menor contenido, lo cual confirma que los polvos usados como lubricantes son excelentes acarreadores de proteínas del látex. (Yunginger *et al.*, 1993; Beezhold *et al.*, 1996; Palosuo *et al.*, 1998, Crippa M *et al.*, 2003). Reportes recientes indican que en algunos guantes de nitrilo se han encontrado proteínas del látex cuya presencia podría explicarse por la adición de látex durante el proceso de fabricación para incrementar sus propiedades elásticas (Villanta *et al.*, 2000) o bien por el uso de las mismas líneas de producción. Los guantes de vinilo están libres de látex. (Crippa M *et al.*, 2003).

En los últimos años los fabricantes de guantes de hule natural han modificando los procesos de fabricación (Perrella WK *et al.*, 2002) con el fin de reducir los niveles de proteínas extraíbles; sin embargo, ninguna de las siguientes técnicas elimina por completo el contenido. Estos métodos son:

- Tratamiento enzimático
- Optimización de los protocolos de lixiviación
- Cloración (libres de polvo)
- Recubrimiento con polímeros
- Radiación UV

El uso de guantes de hule natural continúa siendo frecuente ya que diversos estudios indican que presentan mayor durabilidad, flexibilidad, mejor ajuste, bajo índice de perforación, comparado con los guantes libres de látex. (Palosuo T *et al.*, 2011; Thomas S *et al.*, 2011)

Heveína (Hev b 6.02)

El alérgeno Hev b 6.02 es la proteína más abundante en los lutoides del látex de *H. brasiliensis*, presenta 43 aminoácidos con una masa molecular de 4.729 kDa, y es rica en cisteínas las cuales forman cuatro puentes disulfuro. Esta proteína fue purificada y cristalizada por primera vez en 1960 (Archer BL., 1960). Posteriormente nuestro grupo de trabajo determinó la estructura tridimensional de esta proteína a 2.8 Å de resolución, utilizando técnicas de difracción de rayos X, y se demostró que se trataba de una lectina por su capacidad para unir de forma específica a polímeros de N-acetilglucosamina y quitina (Rodríguez-Romero, *et al.* 1991). Esta proteína posee propiedades antifúngicas *in vitro*, por lo que podría también participar en los mecanismos de defensa de la planta. También se ha propuesto que participa en la coagulación del látex mediante su unión a moléculas de N-acetilglucosamina presentes en una glicoproteína de 22 kDa, la cual se localiza en la superficie de las partículas de hule (Gridrol X *et al.*, 1994). La heveína se sintetiza como un precursor de 20 kDa denominado proheveína (Hev b 6.01), que es procesado por hidrólisis generando Hev b 6.02, que es el dominio amino terminal y un dominio carboxilo terminal de 138 aminoácidos con un peso molecular de 14 kDa (Hev b 6.03) (Yeang HY *et al.*, 2002). Se ha demostrado también que Hev b 6.02 participa en la reactividad cruzada entre el látex, plantas y frutas. En diversos trabajos se ha comprobado que algunos individuos que presentan IgEs contra Hev b 6.02 pueden reconocer proteínas con actividad de quitinasas en plátano, aguacate y kiwi. (Perales Díaz A *et al.*, 2002).

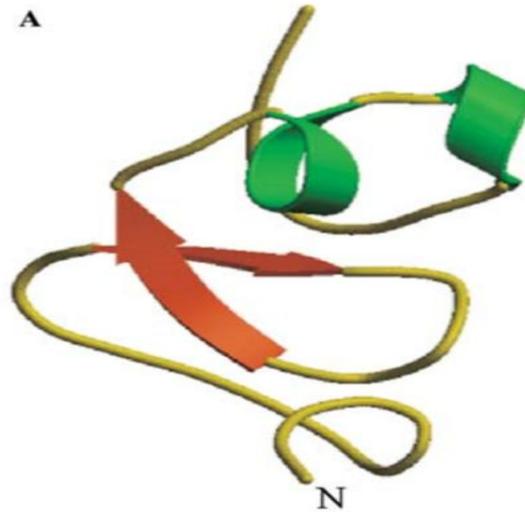
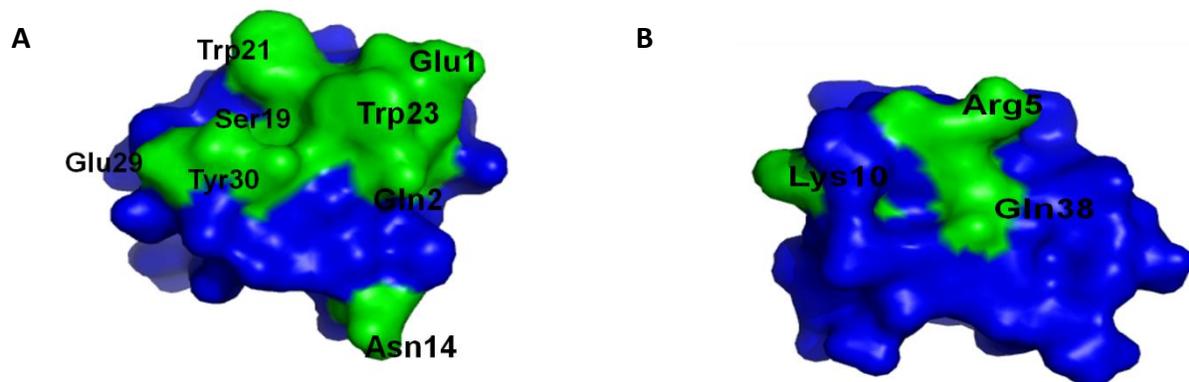


Figura 4. Estructura tridimensional de Hev b 6.02 (Reyes López C *et al.*, 2004)

En el 2004 nuestro grupo de trabajo resolvió la estructura tridimensional de Hev b 6.02 a 1.5 Å de resolución (Figura 4) (PDB: 1Q9B, Reyes López C *et al.*, 2004) donde se propuso un epítipo conformacional (Figura 5A) formado por los residuo Trp21, Trp23 Glu29 y Asn14, utilizando modificación química de los triptófanos y estudios cristalográficos e inmunológicos. En un trabajo paralelo al de nuestro grupo se describieron los aminoácidos Arg5, Lys10, Glu29, Tyr30, His35 y Gln38 como responsables de la unión con las IgE de personas alérgicas (Figura 5B y C) (Karisola *et al.*, 2004).



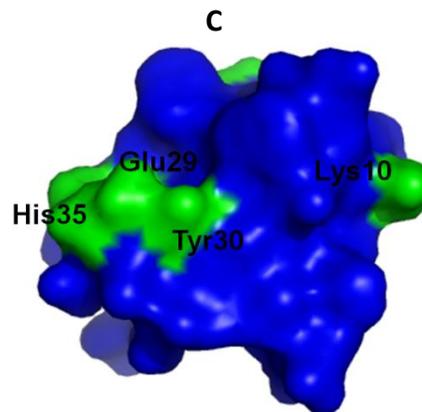


Figura 5. Superficie molecular del Hev b 6.02 donde se muestran los residuos de aminoácidos (azul) que se han propuesto para interacción con las IgEs de pacientes alérgicos. A) Son los residuos propuestos por nuestro grupo de trabajo que forman parte del epítipo conformacional de este alérgeno B) y C) son los residuos propuestos por Karisola et al, 2004. Los cuales forman parte del epítipo conformacional del alérgeno.

Hev b 6.02 es reconocido y afecta a más del 80% de los trabajadores al cuidado de la salud y al 86% de los niños con EB y como se mencionó anteriormente es uno de los alérgenos que se ha identificado y encontrado en mayor abundancia en productos elaborados con látex.

En esta tesis describimos la purificación y la caracterización bioquímica del Hev b 6.02 presente en guantes de látex de *H. brasiliensis*.

Objetivos

Objetivo principal

Determinar si la proteína Hev b 6.02 sufrió alguna modificación durante el proceso de manufactura de guantes de hule de látex natural.

Objetivos específicos

- Extraer y purificar Hev b 6.02 a partir de guantes de látex de la marca Sensimedical y de Hev b 6.02 natural de *Hevea brasiliensis*
- Caracterizar bioquímicamente a Hev b 6.02 de guante

Capítulo II

Metodología Experimental

Material

Para el desarrollo del presente trabajo se analizaron diversas marcas de guantes siendo los guantes para exploración de hule de látex estériles de la marca Sensimedical con lote 00301900900 los que se seleccionaron debido a que presentaron un mejor rendimiento.

Como control positivo se utilizó Hev b 6.02 natural obtenida a partir de lutoides látex de *Hevea brasiliensis* (clona RRIM600).

Extracción y purificación de una proteína alergénica a partir de guante de hule de látex natural

El extracto de guantes de látex se obtiene cortándolos en pequeños pedazos aproximadamente de 1 cm², y adicionando, por cada gramo de guante 5 mL de PBS (0.137 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 0.001 M KH₂PO₄), pH 7.4. La suspensión se mantuvo en agitación por 48 hrs a 4°C, posteriormente el extracto se filtró usando primero un filtro Whatman No.2, y después por una membrana MILLIPORE de 0.45 µm. El extracto se concentró con un sistema AMICON utilizando una membrana de 10 kDa, la fracción que pasó a través de la membrana se aplicó a una columna C-18 FR (Phenomenex®) acoplada a un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC), previamente equilibrada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en agua desionizada. La elución se realizó con un gradiente escalonado de 0-25%, 25-80% y de 80-100% de acetonitrilo (ACN) en TFA al 0.12%.

Extracción y Purificación de Hev b 6.02 natural

El látex de *H. brasiliensis* se centrifugó a 70000 g para obtener la fracción lutoide. Se pesan 10 g de lutoides y se le adiciona el mismo volumen de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 6.6 con 100 mM de NaCl y la mezcla se homogeneiza a 4°C con un homogeneizador POLITRON PT-MR2100. El extracto se centrifugó (35,000 g, 4°C, 45 min) y se midió el volumen para realizar precipitación fraccionada con sulfato de amonio al 65% y después al 100% de saturación. Posteriormente se volvió a centrifugar (35,000 g, 4°C, 45 min).

En este último precipitado se encuentra Hev b 6.02, la cual se redisolvió en agua desionizada y se purificó por una columna C-18 FR (Phenomenex®) acoplada a un equipo HPLC previamente equilibrada con TFA AL 0.1% en agua desionizada. La elución se realizó con un gradiente escalonado de 0-25%, 25-80% y de 80-100% de ACN en TFA al 0.12%.

Cuantificación de proteína total

La cuantificación con Ácido Bicinconínico (BCA) Protein Assay Kit (Thermo scientific™) permitió determinar la cantidad de proteína total obtenida en el extracto de guante. El método se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por los enlaces peptídicos, en un medio alcalino (reacción de Biuret). El color púrpura formado es producto de la reacción de un Cu^{1+} con dos moléculas de BCA, la lectura se realiza a una longitud de onda de 562 nm, de modo que la absorción medida es proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos.

Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA), a diferentes concentraciones, siguiendo el protocolo de Thermo scientific™. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para la lectura de las absorbancias se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

La cantidad de proteína total de las muestras se obtuvo interpolando los datos de las absorbancias en la ecuación de la curva patrón.

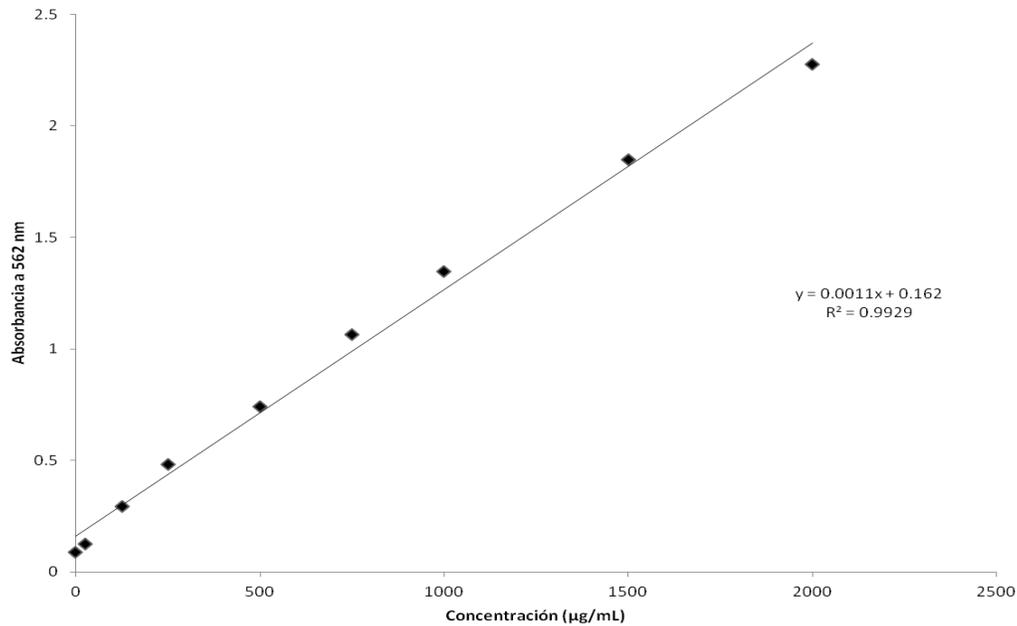


Figura 6. Curva de calibración de proteína utilizando BSA como estándar, método de BCA a 60°C

Electroforesis en gel de Tris-Tricina-SDS-PAGE

La electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE se utiliza para separar proteínas pequeñas en función de su masa molecular. La electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE permite tener un conocimiento acerca de la pureza y la masa relativa de la proteína de interés. Veinte microgramos (μg) de la proteína pura se cargaron a un gel de Tris-Tricina-SDS-PAGE al 16% utilizando una diferencia de potencial de 120 V en un amortiguador de cátodo (1 M Tris, 1M Tricina y 1 % SDS) y de ánodo (1M Tris-Cl) con pH 8.9 y finalmente reveladas con azul de Coomasie G-250.

Espectrometría de masas MALDI-TOF

La masa de la proteína purificada se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight), la cual se caracteriza porque la muestra está embebida en una matriz química en exceso que favorece la ionización y desorción del analito a través de pulsos cortos de láser. A continuación las moléculas ionizadas son expuestas a un gradiente de voltaje en el vacío y aceleradas a una velocidad que depende de su relación masa/ carga (m/z). Cada molécula llega al detector después de un tiempo de vuelo que está relacionado con la relación masa molecular/carga.

La muestra de proteína pura se preparó a una concentración de 0.39 mg/mL, utilizando como matriz α -ácido-4-hidroxicinámico (HCCA) en una solución 30% acetonitrilo, 70% agua y 0.1% de ácido trifluoroacético. El control utilizado para calibrar el equipo fue Hev b 6.02 natural (4.7 kDa). La relación m/z para el ion molecular se obtuvo utilizando un espectrómetro MALDI-TOF Microflex Bruker Daltonics.

Espectro de absorción UV-Visible

Para determinar el espectro de absorción de la proteína de guante y del Hev 6.02 natural se prepararon las muestras en las siguientes concentraciones 0.391 mg/mL y 0.4 mg/mL respectivamente. El barrido se realizó de 200 nm a 350 nm usando una celda de cuarzo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

Dicroísmo Circular

Para determinar si la proteína presentaba estructura secundaria se obtuvo el espectro de Dicroísmo Circular (DC) de la proteína de guante pura y el control de Hev b 6.02 natural en agua con concentraciones de 0.195 mg/mL y 0.273 mg/mL, respectivamente. Para este fin se usó un equipo Jasco J-710 en el UV lejano (190-260 nm), a temperatura constante de 25 °C, utilizando una celda de cuarzo con una longitud óptica de 0.1 cm. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido 20 nm/min. El resultado se expresa en valores de elipticidad (θ) molar ($\text{grado} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$) considerando una masa molecular promedio por residuo de 110 g/mol con la ecuación:

$$\theta_{Molar} = \frac{\theta_{obs} * MW}{[P] * d}$$

Donde θ Molar es elipticidad molar, θ_{obs} es el valor de elipticidad en miligrados, MW es el peso molecular promedio de los aminoácidos, [P] concentración de proteína en mg/cm³ y d es el paso óptico en cm.

Resonancia Magnética Nuclear de ^1H

Para determinar si la proteína se encontraba plegada se obtuvo el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón de la proteína de guante en un equipo Varian Inova de 500 MHz. Se prepararon 400 μL de una disolución 0.5 mg/mL de proteína con 10% D_2O a 25°C para obtener el espectro monodimensional

Espectroscopía de infrarrojo

La espectroscopía de infrarrojo se basa en la incidencia de radiación infrarroja sobre una muestra, la cual provoca cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma. La absorción de radiación por parte de una muestra es indicativa del tipo de enlaces y grupos funcionales presentes en la misma. Una de las principales aplicaciones de la espectroscopía de infrarrojo es la caracterización e identificación de compuestos, por lo que para determinar si la proteína de guante sufrió alguna modificación química durante el proceso de fabricación se obtuvieron los espectros de infrarrojo de la proteína de guante y de Hev b 6.02 en modo película con un miligramo de cada una de ellas. Las muestras se aplicaron sobre placas, se dejó evaporar el disolvente y se obtuvo el espectro en un equipo FT-IR Bruker Tensor 27.

Capítulo III

Resultados y análisis

En este trabajo nos interesó purificar y caracterizar a Hev b 6.02 (heveína) a partir de guantes de cirujano, ya que es uno de los alérgenos más abundantes presentes en productos manufacturados con el látex del árbol de *H. brasiliensis* (Palosuo T *et al.*, 2007; C. Peixinho *et al.*, 2008). De esta manera intentamos determinar si esta proteína sufre alguna modificación química durante el proceso de manufactura. Además fue necesario purificar a Hev b 6.02 natural, el cual se utilizó como control.

Extracción y purificación

El extracto de guante de la marca Sensimedical, que contenía proteínas con masas moleculares relativas entre 10 kDa y 3kDa, se aplicó a una columna de FR en un HPLC. La elución de las diferentes fracciones se realizó con un gradiente escalonado de ACN.

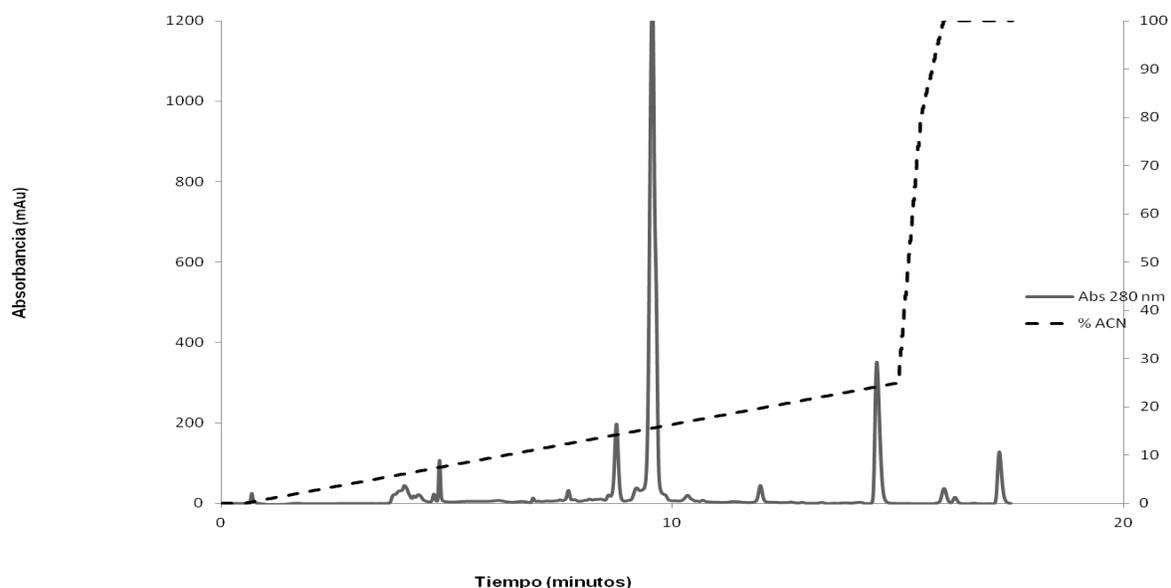


Figura 7. Perfil cromatográfico del extracto de proteínas de guante con masa molecular entre 10 kDa y 3 kDa en una columna de fase reversa C-18.

El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 7 en donde se observa la separación de una fracción principal de otras proteínas de bajo peso molecular. Esta fracción eluyó con un porcentaje del 16%. ACN, que es el mismo porcentaje con el cual eluyó Hev b 6.02 natural (no se muestra el resultado) por lo cual la fracción se recolectó para su caracterización. Este resultado sugiere que aparentemente la proteína no sufre un cambio importante en su hidrofobicidad.

Rendimiento de la purificación

A partir de un guante de cirujano manufacturado con látex de *H. brasiliensis* con un peso de 5.7 g, se obtuvieron 500 µg de la proteína de guante. De acuerdo con los resultados obtenidos tenemos un contenido de Hev 6.02 de guante 87 µg/g de guante. Esta cantidad es superior a la establecida por la norma ASTM D3577 para guantes de uso quirúrgicos y la ASTM D3578 para guantes de exploración, que establece como límite recomendable una cantidad de aproximadamente 50 µg proteínas totales por gramo de guante. La cantidad de proteína pura se encuentra por encima de los valores establecidos por la norma por lo cual el uso de estos guantes en personas alérgicas puede ser considerado de gran riesgo.

Masa molecular

La fracción que eluyó con 16% ACN se sometió a una separación electroforética en un gel Tris-Tricina-SDS-PAGE. La Figura 8 muestra el perfil electroforético, en el cual se observa una sola banda que migró a la misma distancia que el control Hev b 6.02 natural, que tiene una masa molecular de 4.7 kDa, por lo que podríamos decir que se trata de la misma proteína.

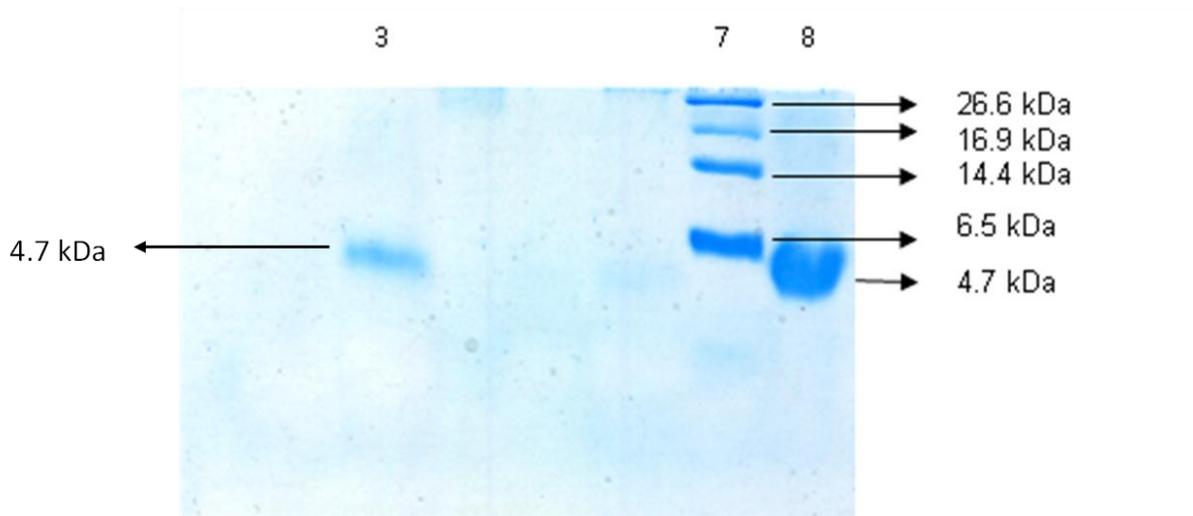


Figura 8. Gel Tris-Tricina-SDS-PAGE 16%. Carril 3) Proteína de guante. Carril 7) Marcadores de peso molecular, 8) Hev b 6.02 natural

Para confirmar este resultado, la masa de los péptidos purificados fue determinada por espectrometría de masas MALDI-TOF. Para Hev b 6.02 natural la relación m/z para el ion molecular (MH^+) de 4720.6 Da y de 2360 Da para el ion MH_2^{2+} , como se muestra en la Figura 9. La proteína de guante muestra una relación m/z para el ion molecular (MH^+) de 4720.7 Da y de 2360 Da para el ion MH_2^{2+} como se muestra en la Figura 10. Este resultado nos confirma que se trata de la misma proteína (Hev b 6.02) y aparentemente sin cambios que modifiquen su masa molecular.

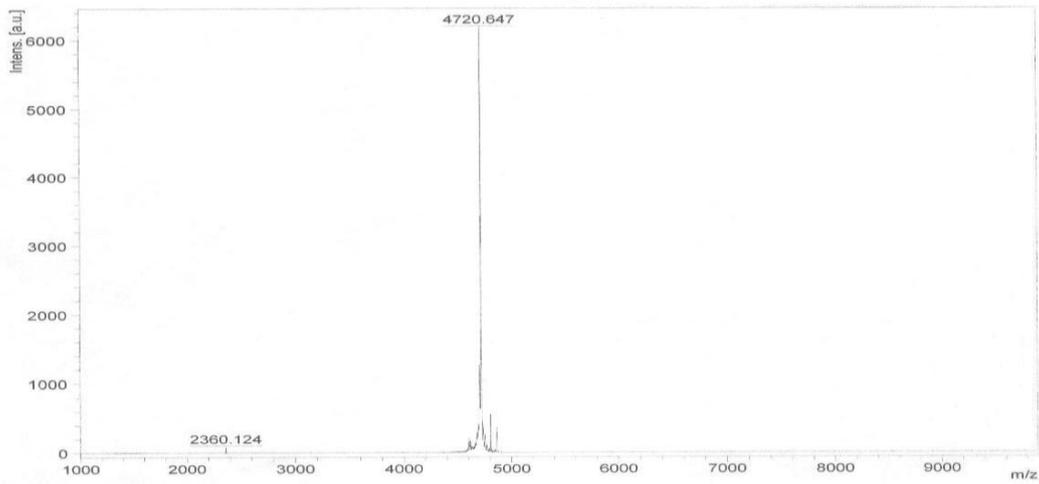


Figura 9. Espectro de masas de Hev b 6.02 natural donde el pico del ion molecular corresponde a la relación m/z 4720.6 Da

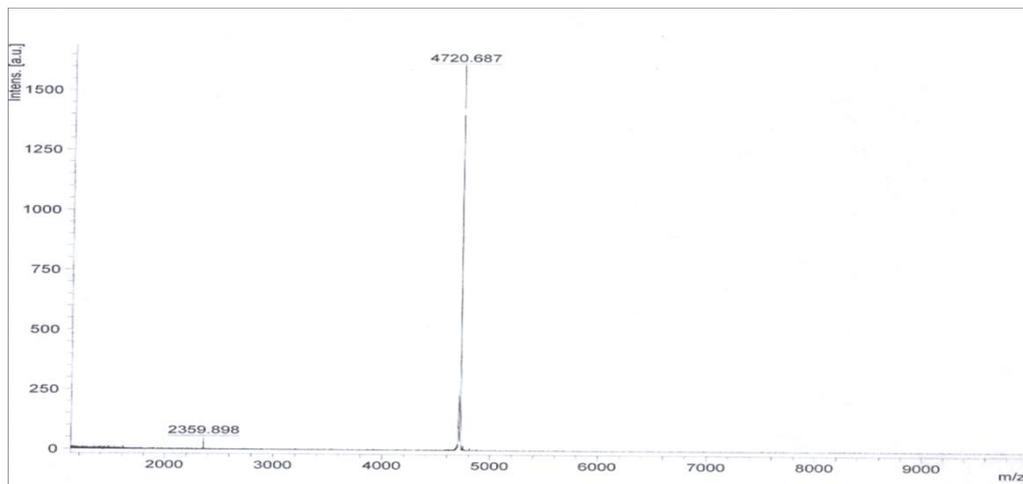


Figura 10. Espectro de masas de la proteína de guante, donde el pico del ion molecular corresponde a la relación m/z 4720.7 Da

Dado que el perfil electroforético y la espectrometría de masas muestran que ambas proteínas tiene la misma masa molecular, podemos sugerir que el alérgeno no sufre ninguna modificación química durante el proceso de fabricación de los guantes.

Como mencionamos anteriormente, durante este proceso se adicionan diversas sustancias químicas que son importantes en la vulcanización, así como otras que permiten aumentar la estabilidad del hule de látex natural, como el amoniaco. Dichas

sustancias pueden causar desnaturalización, modificación e hidrólisis de proteínas (Perella *et al.*, 2002) y, por lo tanto, la formación de nuevos antígenos (Kiljunen SM *et al.*, 1992).

Con los resultados de masa podemos determinar que la fracción mayoritaria presente en los guantes de látex Sensimedical se trata de heveína la cual llamaremos Hev b 6.02 de guante

Espectro de absorción de luz UV-visible

El espectro de absorción de luz UV-visible de Hev b 6.02 de guante y Hev 6.02 natural mostró un máximo de absorción a 279 nm (Figura 11).

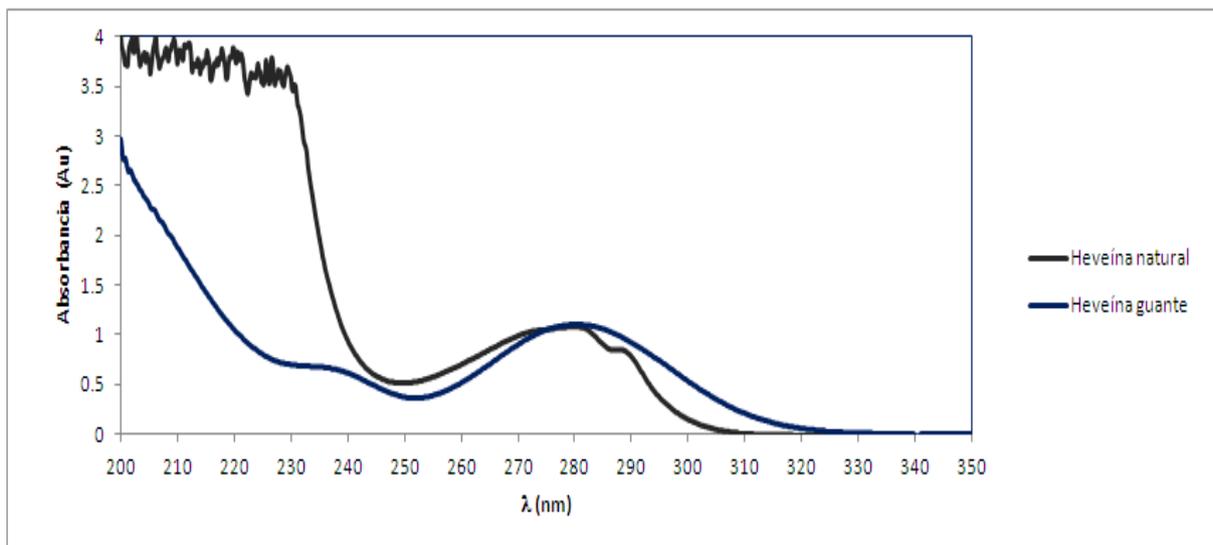


Figura 11. Espectro de absorción de Hev b 6.02 de guante y Hev b 6.02 natural.

Los máximos de absorción para las proteínas son observados alrededor de 280 nm, valor correspondiente a las absorciones promedio de los aminoácidos aromáticos . Las proteínas, dependiendo de su composición de aminoácidos , tienen un espectro de absorción amplio con picos en la región de 275 a 290 nm. El máximo se presenta debido a las contribuciones de los residuos de fenilalanina , tirosina y triptófano y un poco por la cisteína (puentes disulfuro). En Hev b 6.02 natural que presenta dos triptófanos, una tirosina y cuatro puentes disulfuro puede observarse un hombro a 290 nm, el cual corresponde al máximo de absorción que presenta el aminoácido Tyr; sin embargo, en la proteína de guante no se observa esto. Una posible explicación podría ser la presencia de carbohidratos.

Es importante resaltar que los carbohidratos no absorben a 280 nm en su forma natural, pero al ser modificados mediante radiación UV o radiación gamma, las cuales, como mencionamos, se utilizan para disminuir el contenido de proteínas, así como para la esterilización de los guantes, y de esta forma pueden absorber a 280 nm (Roig B. *et al.*, 2003).

Dicroísmo circular

Las propiedades espectroscópicas del Hev b 6.02 de guante se compararon con las de Hev b 6.02 natural. La Figura 12 muestra los dos espectros de dicroísmo circular obtenidos en la región del UV lejano. Se observa que los espectros son prácticamente idénticos con un máximo positivo entre 219 y 221 nm y un mínimo en 190 nm. Cabe señalar que las concentraciones utilizadas para el experimento no fueron las mismas, ya que la concentración de la proteína de guante puede estar sobrestimada debido a la presencia de los azúcares modificados. El primer espectro de dicroísmo circular para Hev b 6.02 se realizó por nuestro grupo de trabajo, donde el máximo positivo atípico se atribuyó principalmente a los ocho residuos de cisteína presentes en esta proteína de sólo 43 aminoácidos, las cuales están formando cuatro puentes disulfuro (Rodríguez-Romero A., 1989). A partir de este tipo de espectros no puede estimarse el contenido de estructura secundaria. Sin embargo, la integridad estructural del Hev b 6.02 de guante puede ser confirmada a partir de la existencia de dichos puentes disulfuro, por lo cual podemos sugerir que la proteína no sufrió desnaturalización durante el proceso de manufactura lo que indicaría que sus epítomos conformacionales podrían estar conservados siendo capaz de inducir reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

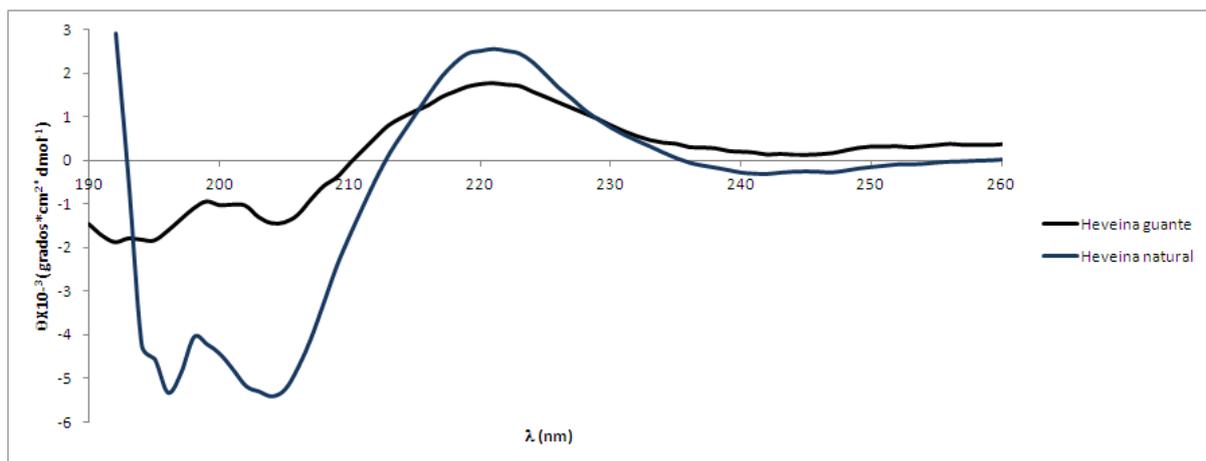


Figura 12. Espectros de dicroísmo circular del Hev b 6.02 natural (línea azul) y del extraído del guante (línea negra)

Resonancia Magnética Nuclear de ^1H

El espectro de Hev b 6.02 de guante (Figura 13) muestra desplazamientos químicos que indican que la proteína se encuentra plegada (el singulete en 9.1 ppm, el multiplete en 8-7.7 ppm, el multiplete 5-4.5 y el multiplete pequeño que se encuentra en 1 ppm). Por otra parte, es importante mencionar que en el espectro de la proteína de guante se observan también desplazamientos muy intensos característicos de carbohidratos (el multiplete de 4-3.2 ppm, el singulete 3 ppm y el triplete en 1.1-1.5 ppm) su presencia se puede deber a que la muestra empleada contuviera una cantidad importante de azúcares modificados. Esto podría explicarse ya que Hev b 6.02 tiene la capacidad de unir de forma específica oligosacáridos de N-acetilglucosamina. Es importante destacar que se pensaba que en el extracto proteico de guantes existían moléculas de diferente naturaleza química porque el rendimiento usando el coeficiente de extinción de la proteína Hev b 6.02 natural ($\epsilon_{278}=2.56 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y la cuantificación con BCA no coincidían. Utilizando el coeficiente de extinción la cantidad de proteína parecía ser mayor debido a que, como mencionamos anteriormente, los azúcares modificados pueden absorber a 280 nm; sin embargo, al realizar la cuantificación con BCA se determinaban cantidades pequeñas de proteína. La presencia de carbohidratos en la muestra se corroboró al obtener el espectro de RMN.

Para evitar la presencia de los azúcares sería necesario modificar el proceso de purificación, utilizando una membrana de ultrafiltración de 3 kDa antes de aplicar a la columna de fase reversa, lo que permitiría eliminar todo aquello que tuviera un bajo peso molecular

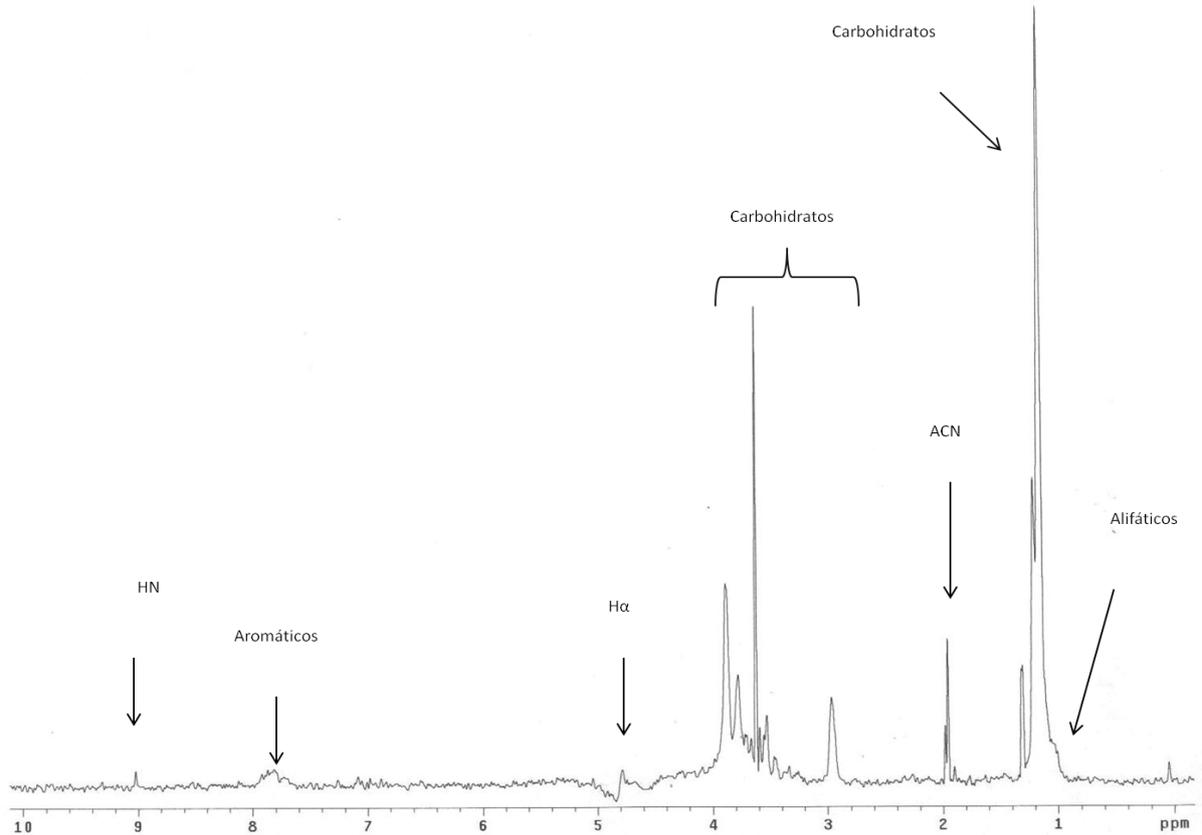


Figura 13. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón de Hev b 6.02 de guante

Espectroscopía de infrarrojo

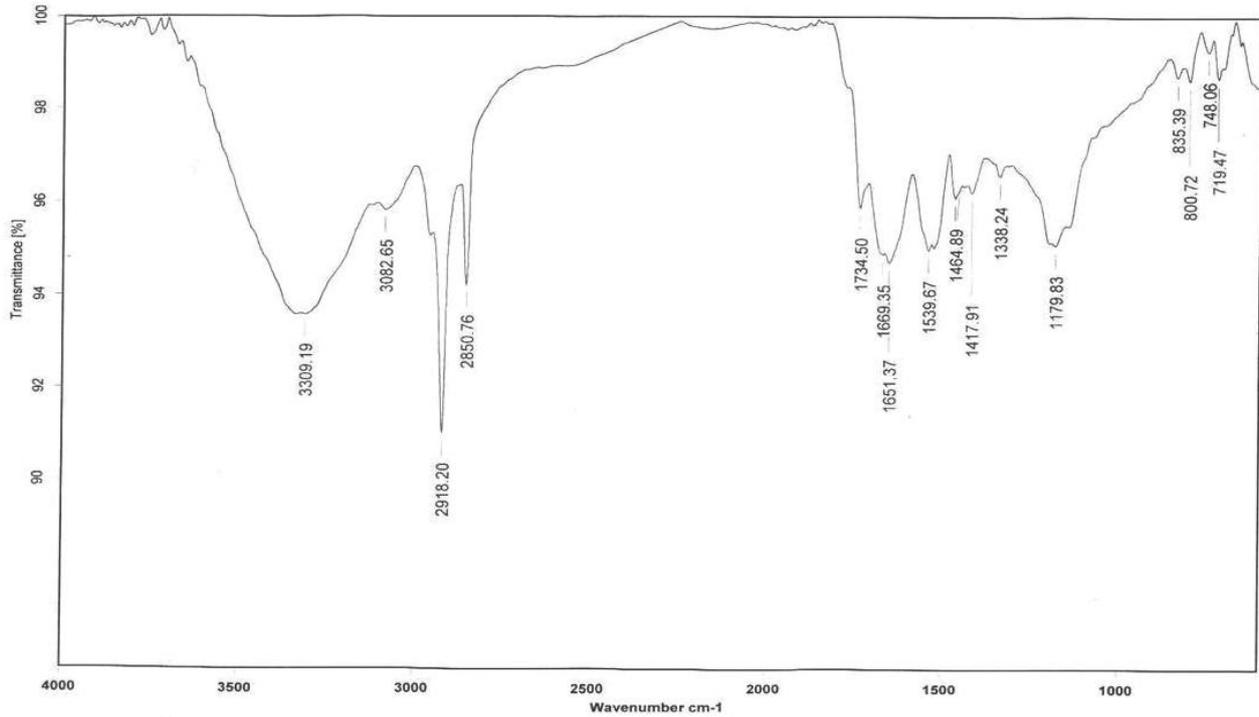


Figura 14. Espectro de infrarrojo medio de Hev b 6.02 natural

El análisis del espectro de infrarrojo de Hev b 6.02 natural muestra las siguientes bandas (Tabla III, Figura 14).

Tabla III. Principales señales del espectro de Hev b 6.02 natural

Grupo funcional	Longitud de onda (cm ⁻¹)
O-H	3309
Instauración aromática	3082
CH ₃	2918
CH ₂	2850
C=O	1669
NH	1539
CH ₂	1464
CH ₃	1417
C-O	1179

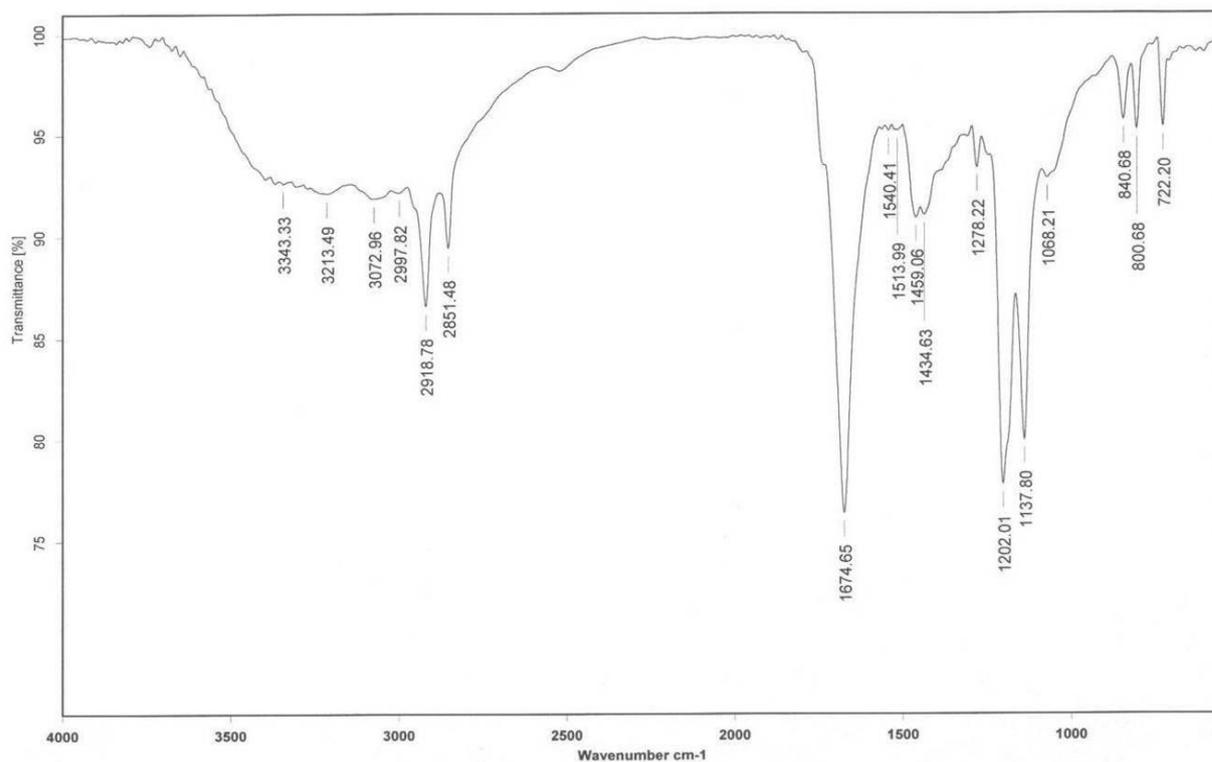


Figura 15. Espectro de infrarrojo medio de Hev b 6.02 de guante

El análisis del espectro de infrarrojo de Hev b 6.02 de guante muestra las siguientes bandas (Tabla IV, Figura 15).

Tabla IV. Principales señales del espectro de Hev b 6.02 de guante

Grupo funcional	Longitud de onda (cm^{-1})
O-H	3343
Instauración aromática	3072
C-H ₃	2918
CH ₂	2851
C=O	1674
NH ₂	1540
CH ₂	1459
CH ₃	1434
C-O	1202
C-O-C	1137

A partir del análisis de los espectros de infrarrojo de la proteína de guante y de la heveína natural se observa que no existen diferencias en la asignación de las señales de los principales grupos funcionales. No obstante, su intensidad si se modifica siendo las señales de los grupos carbonilo (1674.5 cm^{-1}) las más afectadas. Nuevamente como en el caso de la RMN, el aumento en la intensidad de las bandas y las diferencias entre los espectros de la Hev b 6.02 natural y la de guante puede deberse a la presencia de los carbohidratos. Muchos de los grupos funcionales de los carbohidratos coinciden con los de las proteínas, por lo cual la intensidad de determinadas señales como los metilos, hidroxilos, carbonilos pueden estar incrementadas en Hev b 6.02 de guante. Cabe mencionar que podemos observar una banda en 1137 cm^{-1} , la cual corresponde al grupo funcional éter presente en el enlace glucósido de los carbohidratos. Con los resultados obtenidos podemos sugerir que la proteína no sufre ninguna modificación química importante durante el proceso de fabricación de los guantes.

Capítulo IV

Conclusiones

Utilizando guantes de exploración fabricados con látex del árbol del hule *H. brasiliensis* se pudo purificar al alérgeno Hev b 6.02, el cual presentó propiedades espectroscópicas prácticamente idénticas al de la proteína endógena, por lo que se sugiere que la proteína de guante conserva su capacidad para inducir respuestas de hipersensibilidad de tipo I en pacientes con predisposición genética.

Es relevante señalar que los guantes que se utilizaron en este trabajo y que son usados en hospitales y clínicas de este país, no cumplen con la norma internacional ASTM D3578 y, por lo tanto, son potencialmente alergénicos.

Dados los resultados obtenidos en este trabajo sería deseable realizar estudios similares con material quirúrgico manufacturado con hule natural para determinar los contenidos de proteínas, así como llevar a cabo la identificación de los alérgenos presentes en ellos.

Bibliografía

Abbas AK, Lichtman AH, & Pillai S. (2007). Immediate Hypersensitivity. Cellular and Molecular Immunology, 6th Edition, China, Saunders.

Beezhold D, Pugh B, Liss G, Sussman G. (1996). Correlation of protein levels with prick test reaction in patient allergic to latex. J Allergy Clin Immunol , 98:1097–1102.

Brown Robert H, Hamilton Robert G, Mintz Margaret, Jedlicka Anne E, Scott Alan L, Ieberger Steven R. (2005) Genetic Predisposition to Latex Allergy. Anesthesiology, 102: 496-502.

Crippa Michela, Belleri Luca, Mistrello Gianni, Carsana Teresina, Neri Gloria, Alessio Lorenzo. (2003). Prevention of Latex Allergy Among Health Care Workers: Evaluation of the Extractable Latex Protein Content in Different Types of Medical Gloves. Am J Ind Med, 44: 24-31

Crippa Michela, Belleri Luca, Mistrello Gianni, Tedoldi Chiara, Alessio Lorenzo. (2006). Prevention of latex allergy among health care workers and in the general population: latex protein content in devices commonly used in hospitals and general practice. Int Arch Occup Environ Health, 79: 550–557.

Gridrol Xavier, Chresting Hervé, Tana Hui Lang, Kushu Anil. (1994). Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex. J Biol Chem. 269: 9278-9283.

Hawrylowicz C. M., Garra A.O. (2005) Potencial Role of Interleukin-10-Secreting Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. Nature Reviews, 5: 271-283

Karisola P., Mikkola J., Kalkkinen N., Airene K.J., Laitinen O.H., Repo S., Pentikäinen O.T., Reunala T., Turjanmaa K., Johnson M.S., Palosuo T., Kulomaa M.S., and Alenius H.(2004) Construction of hevein (Hev b 6.02) with reduced allergenicity for immunotherapy of latex allergy by comutation of six amino acid residues on the conformational Ig E epitopes. J. Immunology. 172:2621-2628

Kelly Kevin J, Kelly Brian T. (2010). Diagnosis and Treatment of Latex Allergy. Allergy Frontiers: Therapy and Prevention, 5:653-574.

Kiljunen Soili Mäkinen, Turjanmaa K., Palosuo T, Reunala T. (1992). Characterization of latex antigens and allergens in surgical gloves and natural rubber by immunoelectrophoretic methods. *J Allergy Clin Immunol*, 90: 230–235

Midoro H, Edward G, Randall M. (2001). Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann of Allergy, Asthma & Immunol*, 87:261–271

Nettis E, Assennato G, Ferrannini A, Corsi A. (2002). Type I allergy to natural rubber latex and type IV allergy to rubber chemical in health care workers with glove related skin symptoms. *Clin Exp Allergy*, 32: 441-447.

Novak Natalija, Kruse Susanne, Potreck Jana, Maintz Laura, Jenneck Claudia, Weidinger Stephan, Fimmers Rolf, Bieber Thomas.(2005). Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 828- 833.

Palosuo T, Alenius H, Turjanmaa K. (2002). Quantitation of latex allergens. *Methods*, 27: 52–58.

Palosuo T, Makinen-Kiljunen S, Alenius H, Reunala T, Yip E, Turjanmaa K. (1998). Measurement of natural rubber latex allergen levels in medical gloves by allergen-specific IgE-ELISA inhibition, RAST inhibition, and skin prick test. *Allergy*, 53 59–67.

Palosuo T, Reinikka-Railo H, Kautiainen H, Alenius H, Kalkkinen N, Kulomaa M, Reunala T, Turjanmaa K. (2007). Latex allergy: the sum quantity of four major allergens shows the allergenic potential of medical gloves. *Allergy*, 62: 781–786.

Peixinho C. , P. Tavares-Ratado, M.R. Toma's, L. Taborda-Barata, C.T. Tomaz. (2008). Latex allergy: new insights to explain different sensitization profiles in different risk groups.*Br J Dermatol*, 159: 132–136

Perales Díaz A, Monge Sánchez R, Blanco C, Lombardero M, Carillo T, Salcedo G. (2002). What is the role of the hevein-like domain of fruit class I chitinases in their allergenic capacity. *Clin Exp Allergy*, 32: 448-454-

Perrella W. Frank, Gaspari A. Anthony. (2002). Natural Rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods*, 27: 77-86.

Rajan TV. (2003). The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*, 24: 376-379

Reyes López César Augusto, Adela Rodríguez Romero. (2002). Características bioquímicas y moleculares de alérgenos de látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia. Asma e Inmunología Pediátricas*, 11:92-100.

Reyes López CA, Hernández Santoyo A, Pedraza Escalona M, Mendoza G, Hernández Arana, Rodríguez Romero A. (2004). Insights into a conformational epitope of Hev b6.02 (Hevein). *Biochem Biophys Res Commun*, 314: 123-130.

Rihs Hans-Peter, Heimsoth Monika Raulf. (2003). Natural rubber latex allergens: Characterization and evaluation of their allergenic capacity. *New Horizon Allergy*, 3: 1-8.

Rodríguez Romero Adela, Arreguín Barbarín, Arana Hernández Andrés. (1989). Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *Biochim Biophys Acta*, 998:21-24.

Rodríguez Romero A, Ravichandran KG, Soriano García M. (1991). Crystal structure of Hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett*, 291:307-309

Roig B., Thomas O (2003). Rapid estimation of global sugar by UV photodegradation and UV spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 477: 325-329

Thomas S, Aldlyami, Gupta S, Reed MR, Muller SD, Partington PF. (2011). Unsuitability and high perforation rate of latex- free gloves in arthroplasty a cause for concern. *Arch Orthop Trauma Surg*, 131:455–458

Turjanmaa K, Alenius H, Makinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. (1996). Natural rubber latex allergy. *Allergy*, 51: 593-602.

Villanta D, Lomonaco N, Mistrello G, Cappelletti P. (2000). Are always nitril gloves natural rubber protein free? *Allergy* 55(Suppl 63):153 (Abst 531).

Yeang H.Y., Arif S.A.M, Yusof Faridah, Sunderasan E. (2002). Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods*, 27: 32-45.

Yeang H.Y, Cheong Kay Fong, Sunderasan E, Hamzah Samsidar, Chew Nyu Ping, Hamid Sharifah, Hamilton Robert G, Cardoso M.J. (1996). The 14.6 kDa rubber elongation factor (Hev b1) and 24 kDa (Hev b3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 88: 628-639

Yip Esah, Cacioli Paul. (2002). The manufacture of gloves from natural rubber latex. *J Allergy Clin Immunol*, 110: S3-S14.

Yunginger JW, Richard T, Jones BS, Fransway AF, Kelso J, Warner MA, Hunt LW. (1993). Extractable latex allergens and proteins in disposable medical gloves and other rubber products. *J Allergy Clin Immunol*, 93:836–842.